

Aju plastilisuse regulatsioon närviraku adhesioonimolekuli kaudu. Uued närviraku adhesiooni modulaatorid neurodegeneratiivsete ja psüühiliste haiguste ravis

Aleksandr Žarkovski – Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini instituudi farmakoloogia osakond

Ägedad ajuhaigused (insult, ajutrauma) ja kroonilised neurodegeneratiivsed haigused (Alzheimeri tõbi, Parkinsoni tõbi, Huntingtoni tõbi, väikeaju degeneratsioon jt), aga ka psüühilised häired (depressioon, skisofreenia, autism, narkomaania) kujutavad üha suurenevat ohtu rahvatervisele, mõjutades samuti patsientidega koos elavaid inimesi ja nende perekondi.

Nii neurodegeneratiivsetele haigustele kui ka psüühilistele häiretele on iseloomulik aju plastilisuse häirumine. Plastilisust võib määratleda kui aju võimet kohastumuslikeks muutusteks närvisüsteemi ehituses ja talitluses ning seda peetakse aju funktsionaalsuse tähtsaks tunnuseks. Aju vähenenud plastilisus aju arenemise ajal või täiskasvanueas on seotud depressiooni, ärevuse, posttraumaatilise stresshäire, skisofreenia, autismi ning neurodegeneratiivsete haigustega nagu Alzheimeri tõbi või amüotroofiline lateraalskleroos. Ajukahjustuse- ja insuldijärgne paranemine ning funktsiooni taastumine sõltub suuresti säilinud neuronaalsete võrgustike ehituslikust ja talituslikust plastilisusest. Teisest küljest võib epilepsiahoogudest tingitud aju ebanormaalne plastilisus olla vastutav neuronaalsete võrgustike reorganiseerumise ja nn epileptilise aju moodustumise eest.

Aju plastilisuse regulatsioonis kuulub väga tähtis roll adhesioonimolekulidele. Nende kaudu kontrollitakse õppimisprotsesse, meeletolu, samuti funktsioonide taastumist ägedate ning krooniliste neurodegeneratiivsete haiguste korral. Aju plastilisuse regulatsiooni molekulaarsete mehhanismide uurimine võimaldab leida



Aleksandr Žarkovski

aju häirunud plastilisuse uusi biomarkereid neuropsühhiaatriliste häirete ja neurodegeneratiivsete haiguste diagnoosimiseks ning leida uusi ravimeid aju häirunud plastilisuse korrigeerimiseks.

Kõige tähtsamad adhesioonimolekulid, mis osalevad aju plastilisuse regulatsioonis, on närviraku adhesioonimolekul (ingl *neural cell adhesion molecule*, NCAM) ja sünaptilise raku adhesioonimolekulid (sünaptilised CAMid) (1–3).

NCAM on adhesioonimolekulide immuoglobuliini perekonna liige, mis kodeeritakse ühe geeni poolt ning alternatiivse kokku-

põime (ingl *splicing*) tulemusena tekivad kolm peamist isovormi 180, 140 ja 120 kDa (4). Need kolm isovormi erinevad oma tsütoplasmaatiliste domeenide või oma rakumembraanile kinnitumise poolest. NCAMi ekstratsellulaarne domeen sisaldab viit immunoglobuliinisarnast domeeni ja kahte III tüüpi fibronektiini domeeni.

NÄRVIRAKU ADHESIOONIMOLEKUL REGULEERIB NEURONAALSET PLASTILISUST KAHE PEAMISE MEHHAANISMI KAUDU

NCAM loob rakkudevahelise adhesiooni oma ekstratsellulaarsete domeenide homofiilse sidumise kaudu ja tagab seega neuronaalsete võrgustike stabiilsuse. Posttranslatsioonilised modifikatsioonid, mis on tingitud α -2,8-polüsiaalhappe (PSA) ahelate liitumisest NCAMi ekstratsellulaarse domeeni immunoglobuliini (Ig5) mooduliga (5, 6), nõrgendavad NCAMi vahendatud adhesiooni ja tagavad seega plastilisuse: rakkude proliferatsiooni, rakkude migratsiooni, aksonaalse ja dendriitilise fastsikulatsiooni ja jätkete moodustamise, rakkude spetsifitseerumise ning diferentseerumise. PSA liitumine NCAMiga toimub kahe Golgi aparaadiga seotud polüsialüültransferaasi ST8SiaII ja ST8SiaIV kaudu. Üldiselt ekspresseeritakse mõlemat ensüümi peamiselt arenemisperioodil, kuid nende maharegulatsioon toimub täiskasvanueas. Kuigi pärast sündimist väheneb ST8SiaII sisaldus märkimisväärselt, esineb ST8SiaIV ikkagi väikestes kogustes mitmetes suure plastilisusega ajustruktuurides, nagu hipokampus ja prefrontaalne ajukoos, mandeltuum, olfaktoorne süsteem.

Teisena, lisaks PSA rollidele NCAMi vahendatud adhesiooni regulatsioonis kinnitavad paljud tõendid, et PSA-NCAM ja NCAM reguleerivad plastilisust interaktsiooni kaudu türosiinkinaasreteptoriga, nagu fibroblasti kasvufaktori (FGF) retseptor (7, 8), ja ajast pärineva neurotroofse faktori (BDNF) retseptoriga TrkB (9), mis hõlbustavad FGFi või BDNFi vahendatud signaaliülekannet. Meie viimase aja uuringud on näidanud PSA-NCAMi ja NCAMi ning FGFi ja BDNFi vahendatud signaaliülekanderadade vaheliste interaktsioonide tähtsustaju plastilisuse regulatsioonis täiskasvanueas (10, 13).

AJU PLASTILISUS SÕLTUB ADHESIOONIMOLEKULIDE TASAKAALUSTATUSEST

Niisiis sõltubaju plastilisus ja stabiilsus otseselt PSA-NCAMi ja NCAMi tasakaalust. Embrüonaalses ja varajases sünnijärgses perioodis on NCAM leitud olevat polüsialüülitud vormis ning see on tähtis ehitusliku plastilisuse seisukohalt, samas aga sisaldab täiskasvanuaju suurel määral NCAMi, mis tagab närvivõrgustike stabiilsuse. Täiskasvanuajus leidub suures koguses PSA-NCAMi vaid suure plastilisusega piirkondades, kus PSA-NCAM on väga tähtis kesknärvisüsteemi funktsiooni korrigeerimises täiskasvanueas. Mitmed tõendid näitavad NCAMi seotust täiskasvanuhipokampuse neurogeneesiga, mida peetakseaju plastilisuse ja parandamise spetsiifiliseks võimaluseks.

ADHESIOONIMOLEKULID JA AJUHAIGUSED

Üha rohkem tõendeid kinnitavad PSA-NCAMi ning NCAMi seotust mitmesuguste neuropsühhiaatriliste häirete ja neurodegeneratiivsete haigustega, nagu depressioon, skisofreenia, autism, temporaalsagara epilepsia, Alzheimeri tõbi, hulgiskleroos. Meie varasemad mitmetel loomudelitel tehtud uuringud on näidanud PSA-NCAMi ja NCAMi rolli kognitiivsetes häiretes (14), depressioonis (10, 16, 18, 21, 23), ägedas ja kroonilises neurodegeneratsioonis ja epilepsias (12, 16, 17).

Üldiselt on psüühilisi häireid, nagu skisofreenia, depressioon ja autism, seostatud NCAMi ja PSA-NCAMi vähenenud sisaldusega. Neurodegeneratiivsete haiguste, nagu Alzheimeri tõve, insuldi, temporaalsagara epilepsia korral on PSA-NCAMi sisaldus suurenenud ning tõenäoliselt viitab seeaju plastilisuse aktiveerumisele. NCAMi on seostatud ka hulgiskleroosi patogeneesiga. PSA-NCAMi ekspressioon takistab aksonite remüelinisatsiooni ja seega võib PSA-NCAM osaleda haiguse progresseerumises.

Oma uuringutes kasutasime geneetiliselt modifitseeritud hiiri, kellel puudus NCAMi geen. NCAMi puudulikkus põhjustas nendel hiirtel olulisi õppimis- ja mäluhäireid ning esinesid käitumuslikud muutused, mis meenutasid depressiooni (10). Uurisime põhjalikult, kuidas on seotud vähenenud õppimisvõime depressioonisarnase käitumisega. Selleks kasutasime emotsionaalsest

stressist tingitud mälu formeerumist ning vaatasime, kas NCAMi-defitsiitne hiir on võimeline ümber õppima, teiste sõnadega, kas loom on võimeline vabanema negatiivsest mälust. Selgus, et see protsess on oluliselt aeglustunud (9, 14, 18). See võimaldas järeldada, et vähenenud plastilisus ja sellest tulenev kognitiivne häire on otseselt seotud negatiivsete skeemide fikseerumisega, mis on iseloomulik depressiivsele käitumisele. Kuigi depressiooni tekkemehhanismid on suuresti selgusetud, püstitasime hüpoteesi, et depressioonisarnane sümptomaatika on seotud NCAMi vahendatavate radade düsfunktsiooniga.

Kõigepealt leidsime, et NCAMi-defitsiitsetel hiirtel on fosforüülitud CREBi (tsükli-lise AMP vastuselemendiga seonduv valk) sisaldus oluliselt vähenenud (10). Edasine uurimine näitas, et CREBi fosforüülimise vähenemine on tõenäoliselt seotud FGFi-retseptori aktivatsiooni vähenemisega ning CaMKII ja CaMKIV kinaaside fosforüülimise defitsiitsusega (13). Teised rajad, nagu *Srk* kinaaside rada või *FYNI* kinaasi rada, ei olnud NCAMi-defitsiitsetel loomadel häirunud. Samuti uurisime, kas NCAMi-heterosügootsetel hiirtel esinevad depressioonisarnane sümptomaatika ja kognitiivsed häired, ning leidsime, et neil hiirtel esinevad depressioonisümptomid on sarnased homosügootsetel hiirtel esinevatega, aga heterosügootidel puuduvad kognitiivsed häired (18).

Järgmisena tahtsime teada, kas NCAMi toimeid soodustavad molekulid on võimelised funktsioonihäiret vähendama. Selleks sünteesiti koostöös Taani kolleegidega (professorid E. Bock ja V. Berezin) peptiidmolekul, mille järjestus EVYVVAENQQGKSKA hõlmab NCAMi teise fibronektiin-3 mooduli järjestust, mis seondub FGFi-retseptoriga (7). See peptiid sai nimetuse FGL. *In vitro* katsetes indutseeris FGL FGFi-retseptori fosforüülimist ja soodustas primaarsetel hipokampuse neuronitel neuritiide väljakasvu. FGL näitas häid farmakokineetilisi omadusi, püsis kaua aega organismis, oli võimeline läbima hematoentsefaalbarjääri ja kutsus esile FGFi-retseptori aktivatsiooni.

Edasi manustasime NCAMi-defitsiitsetele loomadele FGLi ning uurisime, kas FGL on võimeline avaldama antidepressiivset toimet. Katsed näitasid, et FGL avaldas antidepressiivset toimet NCAMi-defitsiitsetel hiirtel ning toime oli võrdne tuntud

antidepressandi amitriptüliiniga (10, 13). Samuti taastas FGL pärssitud signaalirajad, normaliseerides nii FGFi-retseptori fosforüülimise kui ka CaMKII ja CaMKIV kinaaside fosforüülimise taset. Seega näitasime, et FGL avaldab antidepressiivset toimet, mõjutades FGFi-retseptori – CaMK kinaaside – CREBi kaskaade (13, 19). Need tulemused tõendavad, et NCAMi-defitsiitsus tingib CREBi vahendatud signaaliradade regulatsiooni häirumist neis ajupiirkondades, mis on seotud depressioonisarnase fenotüübiga.

Meie järgmiseks ülesandeks on uurida, milliseid neuronaalse plastilisuse vorme mõjutab sialüültransferaaside puudus. Närviraku adhesioonimolekuli posttranslatsioonilisel modifitseerimisel polüsiaalhappe (polySia) poolt on oluline tähtsus närvisüsteemi arengus ja aju plastilisuses. PolySia kinnitumist katalüüsivad polüsialüültransferaasid ST8SIA2 ja ST8SIA4, kaks ensüümi, millel on erinevad, kuid samas ka ühised funktsioonid arenevas ja täiskasvanu ajus. Üha enam tõendeid seob NCAMi ja polüsialüültransferaaside sisalduse hälbimist neuropsühhiaatriliste häirete, sealhulgas skisofreeniaga.

Et kindlaks teha, kas polüsialüültransferaaside defitsiit võiks põhjustada skisofreeniasarnast fenotüüpi, uurisime neuroanatomiliselt *St8sia2^{-/-}* ja *St8sia4^{-/-}* hiiri ja nende metsikut tüüpi liigikaaslasi ning testisime nende kognitiivseid ja sensoorseid funktsioone. *St8sia2^{-/-}* hiirtel (kuid mitte *St8sia4^{-/-}* hiirtel) olid aju külgvatsakesed suurenenud ja talamuse suurus vähenenud, sellega kaasnes ka väiksem sisekihn ning talamust ja suurajukoort ühendavate kiudude suuresti desorganiseeritud muster. Vesikulaarse glutamaadi transportija VGLUT2 vähenenud sisaldus viitas frontaalkoorde jõudvale nõrgenenud glutamaatergilisele talamokortikaalsele impulsile *St8sia2^{-/-}* hiirtel. Mõlemal polüsialüültransferaaside defitsiitsel liinil oli häiritud ka lühi- ja pikaajaline äratundmismälu, kuid töömälu häirumine ja eelimpulsi inhibeerimise defitsiit esines vaid *St8sia2^{-/-}* hiirtel ning seda sai vähendada klosapiinraviga. Peale selle esines *St8sia2^{-/-}* hiirtel anhedoonne käitumine ja suurenenud tundlikkus amfetamiiniga esile kutsutud liikumisaktiivsuse suurenemise suhtes. Kokkuvõttes kinnitavad need andmed, et vähenenud polüsialüülimine *St8sia2^{-/-}* hiirtel viib ajupatoloogia arenemise ja skisofree-

niasarnase käitumise tekkimiseni. Seega saab arvata, et ST8SIA2-defitsiitsus võib anda arengulise eelsoodumuse skisofreenia tekkeks (20).

KOKKUVÕTE

Kokkuvõttes oleme oma uuringutes näidanud, kuidas NCAM osalebaju plastilisuse regulatsioonis, kuidasaju häirunud plastilisuse võib osaleda psüühiliste ja neurodegeneratiivsete haiguste tekkes. Samuti oleme leidnud uusi võimalusi häirunud plastilisuse normaliseerimiseks ning selle kaudu psüühiliste ja neurodegeneratiivsete haiguste raviks.

TÄNUAVALDUS

Teadustööd on valminud Eesti Teadusfondi granti nr 7955, Euroopa Liidu granti „Promemoria”, institutsionaalse uurimistoetuse 2-3 toel.

KIRJANDUS

1. Cremer H, Chazal G, Carleton A, Goridis C, Vincent JD, Lledo PM. Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13242-7.
2. Amoureux MC, Cunningham BA, Edelman GM, Crossin KL. N-CAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype. *J Neurosci* 2000;20:3631-40.
3. Kiss JZ, Muller D. Contribution of the neural cell adhesion molecule to neuronal and synaptic plasticity. *Rev Neurosci* 2001;12:297-310.
4. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, et al. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 1987;236:799-806.
5. Seki T, Arai Y. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res* 1993;17:265-90.
6. Rougon G. Structure, metabolism and cell biology of polysialic acids. *Eur J Cell Biol* 1993;61:197-207.
7. Kiselyov VV, Soroka V, Berezin V, Bock E. Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *J Neurochem* 2005;94:1169-79.
8. Rutishauser U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2008;1:26-35.
9. Vutsits L, Djebbara-Hannas Z, Zhang H, et al. PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons. *Eur J Neurosci* 2001;13:1391-402.
10. Aonurm-Helm A, Jurgenson M, Zharkovsky T, et al. Depression-like behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM)-deficient mice and its reversal by an NCAM-derived peptide, FGL. *Eur J Neurosci* 2008;28:1618-28.
11. Aonurm-Helm A, Zharkovsky T, Jurgenson M, Kalda A, Zharkovsky A. Dysregulated CREB signaling pathway in the brain of neural cell adhesion molecule (NCAM) deficient mice. *Brain Res* 2008;1243:104-12.
12. Jaako K, Zharkovsky T, Zharkovsky A. Effects of repeated citalopram administration on kainic acid-induced neurogenesis in adult mouse hippocampus. *Brain Res* 2009;1288:18-28.
13. Aonurm-Helm A, Berezin V, Bock E, Zharkovsky A. NCAM-mimetic, FGL peptide, restores disrupted fibroblast growth factor receptor (FGFR) phosphorylation and FGFR mediated signaling in neural cell adhesion molecule (NCAM)-deficient mice. *Brain Res* 2010;1309:1-8.
14. Jurgenson M, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A. Behavioral profile of mice with impaired cognition in the elevated plus-maze due to a deficiency in neural cell adhesion molecule. *Pharmacol Biochem Behav* 2010;96:461-468.
15. Bragina O, Sergejeva S, Serg M, et al. Smoothed agonist augments proliferation and survival of neural cells. *Neurosci Lett* 2010;482:81-5.
16. Procaccini C, Aitta-Aho T, Jaako-Movits K, et al. Excessive novelty-induced c-Fos expression and altered neurogenesis in the hippocampus of GluA1 knockout mice. *Eur J Neurosci* 2011;33:161-74.
17. Jaako K, Aonurm-Helm A, Kalda A, et al. Repeated citalopram administration counteracts kainic acid-induced spreading of PSA-NCAM-immunoreactive cells and loss of reelin in the adult mouse hippocampus. *Eur J Pharmacol* 2011;666:61-71.
18. Jurgenson M, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A. Partial reduction in neural cell adhesion molecule (NCAM) in heterozygous mice induces depression-like behaviour without cognitive impairment. *Brain Res* 2012;1447:106-18.
19. Enevoldsen MI, Kochoyan A, Jurgenson M, et al. Neuroprotective and memory enhancing properties of a dual agonist of the FGF receptor and NCAM. *Neurobiol Dis* 2012;48:533-45.
20. Kröcher T, Malinovskaja K, Jurgenson M, et al. Schizophrenia-like phenotype of polysialyltransferase ST8SIA2-deficient mice. *Brain Struct Funct*, 2015. DOI 10.1007/s00429-013-0638-z.
21. Jaako-Movits K, Zharkovsky A. Impaired fear memory and decreased hippocampal neurogenesis following olfactory bulbectomy in rats. *Eur J Neurosci* 2005;22:2871-8.
22. Jaako-Movits K, Zharkovsky T, Pedersen M, Zharkovsky A. Decreased hippocampal neurogenesis following olfactory bulbectomy is reversed by repeated citalopram administration. *Cell Mol Neurobiol* 2006;26:1559-70.
23. Heidmets LT, Zharkovsky T, Jurgenson M, Jaako-Movits K, Zharkovsky A. Early post-natal, low-level lead exposure increases the number of PSA-NCAM expressing cells in the dentate gyrus of adult rat hippocampus. *Neurotoxicology* 2006;1:39-43.